SISTEMÁTICA MOLECULAR: COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES MÉTODOS Y SUS APLICACIONES

MAHINDA MARTÍNEZ

Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Querétaro,
Cerro de las Campanas s/n. Querétaro 76010, México.

Resumen. En los últimos años el uso de técnicas moleculares para resolver problemas sistemáticos se ha vuelto muy común. Entre las técnicas usadas en botánica se encuentran la hibridización ADN/ADN que consiste en reasociar cadenas de diferentes especies o géneros cercanos siempre que las diferencias no sean mayores al 20%. La electroforesis de iso y aloenzimas tiene la ventaja de poderse aplicar a una mayor variedad de problemas como determinar la divergencia en taxa infraespecíficos, delimitar especies, reconstruir filogenias así como determinar especiación híbrida y poliploidía. Las enzimas de restricción se utilizan para cortar ADN ribosomal para detectar divergencia entre especies, complejos de especies y entre géneros; en cloroplasto para detectar ancestros de plantas cultivadas, para delimitar clasificaciones subgenéricas de tribus, subfamilias, orden, clase y subclase. Las secuencias de nucleótidos se han usado en genes nucleares o de cloroplasto, seleccionándose aquellos de evolución conservada para problemas a nivel de familia y subfamilia y los de evolución rápida para géneros, subgéneros y secciones.

Palabras clave: Sistemática, técnicas moleculares, descripción, aplicación.

Abstract. The use of molecular techniques to solve systematic problems has become very popular in recent years. One technique used in botany is DNA/DNA hybridization, in which single strands of DNA from closely related genera or species are reassociated, but requires that differences in sequences between taxa are lower than 20%. Iso and allozyme electrophoresis is another technique which has the advantage of a wider range of applications, such as the divergence of infraespecific taxa, species delimitation, phylogenetic reconstruction, hybrid speciation, and detection of polyploidy. Restriction enzymes are used to cut ribosomal DNA to detect differences at the species level, for species complexes and among genera. These enzymes are also used to cut chloroplast DNA to determine the ancestry of cultivated plants, as well as, to delimit subgeneric, tribal, subfamilial, order, subclass or class classifications. Nucleotide sequences have been used in nuclear or chloroplast genes utilizing slow evolving genes for separation at the family or subfamily levels and fast evolving genes for delimiting genera, subgenera or sections.

Key Words: Systematics, molecular technique, description, application.

La sistemática es la rama de la biología que trata de detectar, describir y explicar la diversidad biológica (Moritz y Hillis, 1996). Los primeros sistemas de clasificación como el de Linneo de 1735, consistían simplemente en asignar jerarquías de manera que se pudiera recuperar la información. Los siguientes sistemas utilizaron numerosos caracteres seleccionados *a posteriori* para producir una clasificación llamada "natural", como los desarrollados por Jussieu hacia finales de 1700. La teoría de Darwin sobre el origen de las especies ha servido más para explicar los patrones de similitud observados que para alterar la

clasificaciones existentes, sobre todo en las más recientes (filéticas) como las de Engler y Prantl de 1887-1915 (Stuessy, 1990). En todos los sistemas de clasificación elaborados hasta mediados del presente siglo, las decisiones se tomaron de manera intuitiva, arbitraria y sin criterios rigurosos, por lo que Bremer y Wanntrop (1978) concluyeron que la clasificación filética no se podía considerar ciencia, sino un arte altamente personal no reproducible. Esta inconformidad con el análisis subjetivo de la información llevó al desarrollo de métodos de análisis más rigurosos, la fenética, basada en similitud general

Tabla1. Niveles taxonómicos en los que funciona cada técnica.

Técnica	Genoma	Nivel
Hibridización ADN/ADN	Completo, se elimina el ADN altamente repetido	Géneros cercanos Especies cercanas
Electroforesis de enzimas	Enzimas expresadas de cualquier genoma	Entre y dentro de poblaciones Categorías inferiores a especie Especie
Enzimas de restricción	ADN ribosomal	Especies Complejos de especies Géneros
	ADN cloroplasto completo	Dentro de poblaciones Especies Géneros Tribus
	ADN cloroplasto región repetida	Orden Subclase Clase
Secuencias	ADN nuclear ribosomal ITS 1 y 2, 5.8S	Género Subgénero Sección
	ADN nuclear ribosomal 18S, 26S	Género Familia
	ADN de cloroplasto rbcL	Subfamilia Familia Orden
	ADN de cloroplasto ndhF	Familia

("overall similarity") obtenida por el análisis estadístico de un gran número de caracteres (Stuessy, 1990), y la cladística que reconstruye las genealogías de los organismos para proponer su clasificación (Scotland, 1992; Mayr, 1974).

Las fuentes de información taxonómica hasta principios de los años cincuenta fueron la toma directa de características morfológicas, anatómicas, embriológicas, palinológicas y citológicas. No fue sino hasta mediados de los cincuenta cuando se inició la etapa experimental de la sistemática, al incluirse el uso de la química secundaria para la obtención de datos, sobre todo de flavonoides, en muchos trabajos de taxonomía clásica. El uso de esta metodología se extendió hasta los años ochenta (Crawford, 1989).

El uso de marcadores moleculares para resolver problemas taxonómicos en plantas se inició en la década de los setenta con la electroforesis de enzi-

mas (Gottlieb, 1971), y hacia los ochenta las técnicas de manipulación y análisis habían avanzado lo suficiente como para poder estudiar la variación de ADN y ARN (Moritz y Hillis, 1996). Las tres grandes áreas de aplicación de la sistemática molecular son la estructura genética de poblaciones (como variación geográfica, heterocigosidad), delimitación de especies (incluyendo híbridos) e inferencia filogenética (Bavertock y Moritz, 1996). Actualmente, el uso de estos marcadores se ha vuelto tan común, que de 71 trabajos publicados en la revista *Systematic Botany* en 1994 y 1995, 37 (el 52%) incluían técnicas moleculares.

La popularidad de estos métodos se basa en que cualquier carácter utilizado para un análisis sistemático debe reflejar cambios genéticos. La eficacia sistemática del carácter utilizado será mayor si no es el resultado de la influencia del medio sobre el fenotipo, por lo que el uso directo del material genético

debe aportar los caracteres más fundamentales para una clasificación (Crawford, 1990), con la ventaja adicional de que el número de datos que se pueden obtener está limitado sólo por el tamaño del genoma (Hillis, 1987). Estos datos, debido en parte al gran número de caracteres involucrados, se analizan por métodos de distancia, parsimonia o máxima similitud con los que se obtiene una filogenia (revisados en Swofford *et al.*, 1996).

A pesar de su frecuente utilización, existen fuertes controversias sobre el uso de datos moleculares en sistemática. Una de ellas es que si los datos morfológicos son mejores que los moleculares para inferir filogenias o viceversa, a pesar de que hay pocos estudios comparativos y los existentes han demostrado que la divergencia morfológica y la molecular son muy independientes (Wilson *et al.*, 1974, 1977). Hillis (1987) concluye que la combinación de datos moleculares con los morfológicos maximizará, tanto la utilidad como el contenido de la información, y este tipo de análisis son los que se están haciendo (por ejemplo Chase *et al.*, 1995; Uhl *et al.*, 1995; Kress, 1995).

Otro punto de desacuerdo es el uso de las filogenias obtenidas. La mayoría de los autores usan estas filogenias de una u otra forma para tomar decisiones taxonómicas y construir una clasificación (Nelson, 1973; Wiley, 1980), pero otros autores sostienen que la clasificación y la reconstrucción filogenética son actividades separadas y complementarias que deben mantenerse así (Felsenstein, 1984; Mayr, 1981). Dowling *et al.* (1996) señalan que las filogenias obtenidas son de las moléculas, que pueden diferir de la de los organismos debido, entre otras cosas, a introgresiones y conversiones de genes.

Una de las principales limitantes para el uso de técnicas moleculares, sobre todo en nuestro país, es que son caras comparadas con las técnicas tradicionales. Chiang *et al.* (1994) encontraron que de 137 trabajos publicados por mexicanos entre 1991-1993, 60 (43%) incluían el uso de marcadores moleculares.

Las técnicas moleculares que se han usado para resolver problemas taxonómicos en plantas son la secuencia de aminoácidos, serología, hibridación ADN-ADN, electroforesis de enzimas, enzimas de res-

Figura 1. Técnica de hibridación ADN/ADN

tricción y secuencia de ácidos nucleicos. Las dos primeras han tenido un impacto marginal debido a problemas de técnica o interpretación y no se tratarán aquí. Crawford (1990) presenta un resumen de las dos así como ejemplos de su aplicación en botánica. Del resto de las técnicas se presentan las razones que respaldan su utilización, la descripción de la técnica, el tipo de problemas taxonómicos al que se pueden aplicar (ver tabla 1), así como sus limitaciones. Se excluye de este trabajo el análisis de datos. Este tema ha sido tratado en detalle por Swofford *et al.* (1996). Debido a lo abundante de la literatura, sólo se dará aquí un panorama general, sin hacer un análisis exhaustivo de las referencias sobre el tema.

Hibridización ADN/ADN

El método se basa en que el ADN de una cadena se unirá a otra siempre y cuando los nucleótidos de ambas cadenas sean lo suficientemente complementarios (es decir, A-T y C-G) (Crawford, 1990). Teóricamente, la hibridización de ADN mide la suma de las diferencias que han ocurrido entre los taxa desde que divergieron de un ancestro común, pero los datos que se obtienen son de distancias y no directamente los cambios en nucleótidos (Sheldon y Kinnarney, 1993).

Las cadenas reasociadas de la misma especie (homoduplex) sirven como índice de divergencia cuando se compara con las cadenas reasociadas de diferentes especies (heteroduplex). Las moléculas heteroduplex contendrán errores en la unión de los pa-

res de nucleótidos debido a su divergencia evolutiva a partir de un ancestro común (Werman *et al.*, 1996). Entre más complementarias sean las cadenas, más fuertes serán sus uniones químicas.

Técnica

El ADN de las especies a estudiar se aísla y se purifica. Se reduce a longitudes de 300-500 nucleótidos mecánicamente (por ejemplo por sonificación) y se desnaturaliza a una cadena ya sea por calor o alcalinidad. El ADN de una cadena de una especie se marca con un radioisótopo ("tracer") y se pone en contacto con ADN de una cadena no marcado ("driver") de otra especie. Las condiciones de reasociación (como concentración de sales, temperatura, viscosidad, tamaño de los fragmentos) determinarán qué tantas bases equivocadas se pueden reasociar en la molécula híbrida. A concentraciones bajas de sal y altas temperaturas, sólo las bases perfectamente correspondientes se van a reasociar. La cantidad de hibridización en las cadenas heteroduplex se divide por la homoduplex y se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de hibridización normal.

El ADN reasociado se separa del no asociado al pasar por una columna de hidroxipatita (ver figura 1) y las dos medidas de similitud que se utilizan son 1] la proporción del ADN que se reasoció y 2] la estabilidad térmica del ADN reasociado (Werman *et al.*, 1996; Sheldon y Kinnarney, 1993).

Figura 2. Bandas de enzimas Fosfoglucomutasa (PGM, un monómero) obtenidas por electroforesis en almidón de 20 individuos de *Beaucarnea recurvata*. En este caso se observa una isoenzima (PGM_1) y las bandas representan individuos con alelos homocigotos (aa en las bandas superiores bb en las inferiores, señalados por flecha blanca) y heterocigotos (ab en las bandas dobles, señalado por flecha negra).

Aplicación

La técnica nunca se utilizó extensivamente en botánica y parece haber caído totalmente en desuso porque es cara, lenta y poco confiable para diferencias mayores al 20%. Las comparaciones siempre son de una especie contra otra por lo que es difícil de aplicar a un estudio de numerosas especies y se requieren cantidades grandes de ADN (Crawford, 1990). Los datos que se obtienen son de distancia, por lo que no pueden usarse en análisis de caracteres primitivos y derivados. La selección del grupo externo para el análisis filogenético se debe hacer por métodos independientes a la hibridización (Sheldon y Kinnarney, 1993).

Este método se usó para comparar relaciones entre géneros de gramíneas (*Hordeum*, *Avena*, *Secale* y *Triticum*) en los que *Triticum* y *Secale* resultaron más relacionados entre sí, después *Hordeum* y el menos relacionado es *Avena*. La relación encontrada entre los géneros está en concordancia con la inferida por otros métodos (Bendich y McCarthy, 1970). También se utilizó entre especies de *Cucurbita* (Goldberg *et al.* 1972) y de *Atriplex* (Belford y Thompson, 1981).

Electroforesis de enzimas

La variación de las enzimas se puede analizar al someter extractos de tejidos a electroforesis en diferentes geles que después se sumergen en tinciones específicas para cada enzima. La información de proteínas que se puede obtener simultáneamente de la electroforesis son las isoenzimas (formas de enzimas producidas por diferentes loci), y las aloenzimas (diferentes alelos de un mismo locus) (Wendel y Weeden, 1989).

Gottlieb (1973, 1974) encontró que la divergencia en los genes que codifican para las enzimas es frecuentemente independiente de la especiación, es decir, puede haber especiación sin que haya una divergencia mayor a la que hay entre poblaciones de la misma especie. Por el contrario, Whalen (1979), Crawford y Bayer (1981) y otros, han encontrado que puede haber divergencia en las aloenzimas entre poblaciones de una misma especie. Estas diferencias han permitido que la electroforesis de enzimas se puedan usar a muy diferentes niveles taxonómicos, como calcular la divergencia entre variedades o subespecies, delimitar especies morfológicamente similares, estimar relaciones entre especies y determinar el origen de especies híbridas o poliploides.

Técnica

El tejido a utilizar puede provenir de partes vegetativas (hoja, tallo, raíz), de diferentes partes de la se-

millas, granos de polen o frutos. Las enzimas se obtienen directamente con buffers de extracción sin necesidad de purificaciones adicionales. El extracto se pone a migrar según sus cargas eléctricas en cualquiera de los 4 tipos de geles: almidón, poliacrilamida, acetato de celulosa o agarosa. Murphy *et al.* (1996) resumen las ventajas y desventajas de cada uno, pero para estudios en los que se necesita analizar varias enzimas de muchos individuos, se prefiere el de almidón que permite analizar hasta seis enzimas por gel.

Después de la electroforesis, las enzimas se detectan *in situ* por medio de tinciones específicas. La detección se lleva a cabo por la precipitación de colorantes que tiñen en zonas de actividad enzimática (ver figura 2). Wendel y Weeden (1989), Murphy *et al.* (1996) y Werth (1985) detallan cómo montar un laboratorio y proporcionan las fórmulas de los buffers, tinciones más utilizadas y la técnica de análisis de las bandas. De alrededor de 200 enzimas que se pueden teñir, sólo 40 han resultado útiles para plantas (Wendel y Weeden, 1989).

Aplicación

1. *Divergencia en taxa infraespecíficos*: se ha encontrado que algunas variedades o subespecies tienen identidades genéticas altas (mayores a 0.90), similares a las encontradas entre poblaciones de la misma especie, que no se han reconocido taxonómicamente. Esto sugiere que las diferencias morfológicas utilizadas para distinguir taxa infraespecíficos (como subespecie o variedad) se desarrollan antes de que haya divergencia en las isoenzimas. Esto se hace más evidente en plantas cultivadas (McLeod *et al.*, 1983; Pinkas *et al.*, 1985) debido a la fuerte selección humana sobre ciertos caracteres morfológicos.

En variedades disyuntas que seguramente han estado aisladas por largo tiempo, las diferencias morfológicas corresponden a identidades genéticas más bajas de 0.83 o 0.71 (Whalen, 1979) debidas probablemente a la falta de intercambio genético entre sus poblaciones.

En general, las isoenzimas de los taxa infraespecíficos simpátricos han divergido menos que las de los alopátricos, lo que probablemente refleja la falta de flujo genético en taxa aislados geográficamente (Crawford, 1990).

2. *Delimitación de especies*. Las aloenzimas se han utilizado en varios casos (Jeffries y Gottlieb, 1982; Nickrent *et al.*, 1984) como caracteres adicionales para determinar si se pueden reconocer como diferentes especies morfológicamente muy similares. Los datos de enzimas se usan por lo general en combinación con

3' C T T A A G	G A G C T C
5' G A A T T C	C T C G A G
Eco RI	Xho I

Figura 3. Secuencias de reconocimiento de Eco RI y Xho I a partir de la porción 3' y 5'. La secuencia es la misma si se lee a partir de la porción 3' o de la 5'.

otras fuentes de información taxonómica, como morfología, números cromosómicos y patrones de distribución. En general, diferentes especies pertenecientes a un mismo género presentan identidades genéticas más bajas que las de poblaciones de una misma especie.

3. Relaciones entre especies. En varios estudios con especies congénicas morfológicamente similares (Gottlieb, 1973, 1974; Rick *et al.*, 1976) se han encontrado identidades genéticas comparables a las de poblaciones de la misma especie, lo que se ha interpretado como ejemplo de una especiación rápida y reciente. En combinación con datos sobre cromosomas, distribución y abundancia, se han postulado las especies progenitoras y sus derivadas (Gottlieb 1973).

En especies de islas oceánicas que tienen un origen común, se han encontrado identidades genéticas de entre 0.86 y 1.0 (Lowrey y Crawford, 1985; Crawford *et al.*, 1987), tanto dentro como entre poblaciones de una misma especie, así como entre diferentes especies, a pesar de que las plantas, son morfológicamente muy diferentes y ocupan diversos hábitats.

Figura 4. Organización del ADN nuclear ribosomal con las unidades 18S, 5.8S y 25S. El espaciador interno transcrito (ITS) flanquea a la región del 5.8S. Las regiones conservadas son la 18S y la 25S, mientras que los espaciadores transcritos son mucho más variables.

4. Reconstrucción filogenética. A pesar de que los métodos de análisis de datos de aloenzimas para determinar filogenias son altamente controvertidos, y algunos incluso inválidos, se han usado para proponer relaciones intragenéricas analizándose los loci como caracteres discretos (Buth, 1984). Por ejemplo, en *Solanum*, la filogenia obtenida con aloenzimas y la morfológica mostraron relaciones similares para varias especies (Whalen y Caruso, 1983). A niveles por arriba de especie, se debe tener mucho cuidado al utilizar como carácter filogenético la duplicación, ya que no se puede saber si las enzimas extras se perdieron o se ganaron en determinados linajes (Crawford, 1989).

5. Determinación de especiación híbrida y poliploidía. El uso de aloenzimas para detectar especies de origen híbrido se basa en el hecho de que los alelos de un locus producen diferentes aloenzimas que se heredan como codominantes, por lo que es posible detectar si un presunto híbrido tiene o no las aloenzimas características de sus padres putativos (Crawford, 1989). Los poliploides pueden dividirse en alopoliploides (aquellos con genomas bien diferenciados) y autopoliploides (con genomas idénticos). Por medio de aloenzimas, Werth *et al.* (1985) demostraron un origen alopoliploide para *Asplenium*, detectando los alelos únicos de los presuntos padres.

La detección de autopoliploides se basa en la idea de que los genomas son idénticos, por lo que los alelos deben ser los mismos que los del progenitor y en el análisis del gel el patrón de bandas se ve duplicado. Esto se ha encontrado en varios estudios, por ejemplo Epes y Soltis (1984), Soltis y Rieseberg (1986).

Enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción son endonucleasas producidas por bacterias como mecanismos de defensa contra ADN extraño. Cada enzima corta la doble cadena de ADN en un sitio de reconocimiento específico y simétrico, ya que es el mismo si se lee a partir de la porción 5' o de la 3' de cada cadena (ver figura 3). Dependiendo de dónde corte, pueden quedar porciones colgantes en la cadena 5', en la 3' o en ninguna, y esta simetría permite que la cadena se pueda volver a unir (Dowling *et al.*, 1996). Las enzimas pueden cortar ADN ya sea nuclear o de organelos, si bien el mitocondrial no se usa en sistemática vegetal debido a los frecuentes rearrreglos (Dowling *et al.*, 1996). Del nuclear, la porción más usada es el ADN ribosomal (ver figura 4) que se puede usar a muy diferentes niveles taxonómicos debido a que los genes que codifican para el 18S y 25S son muy conservados, mientras que los espaciadores (transcritos) son

altamente variables (Bult y Zimmer, 1993). Una de las limitantes es que el ADN ribosomal está metilado, es decir que tiene un grupo metilo en la molécula, por lo que hay menos enzimas que lo corten.

El ADN más utilizado con esta técnica es el de cloroplasto (ver figura 5) ya que tiene pocos rearrreglos, es pequeño, tiene pocas mutaciones puntuales, generalmente se hereda por línea materna, y en los casos en que se hereda por los dos padres, no hay recombinación. El ADN de cloroplasto, al igual que el ribosomal, presenta zonas con diferente variabilidad. La porción repetida inversa es muy poco variable en sus sitios de restricción, por lo que se puede usar a niveles taxonómicos más altos que familia, como orden, subclase y clase (Downie y Palmer, 1994; Olmstead y Palmer, 1992) que el genoma completo. Olmstead y Palmer (1994) presentan una revisión sobre el uso de ADN de cloroplasto en sistemática.

La especificidad de las enzimas en los sitios de corte implica que un ADN dará fragmentos reproducibles. Los cambios en el número y/o tamaño de los fragmentos pueden deberse a que haya 1] un rearrreglo en la secuencia: una inversión reducirá el tamaño de un fragmento e incrementará el otro en la misma cantidad, 2] una adición o delección de ADN: una duplicación directa tandem resultará en un fragmento adicional del tamaño de la duplicación; la adición o pérdida de ADN entre 2 sitios de restricción aumentará o reducirá el tamaño de ese fragmento en la cantidad correspondiente, y 3] una sustitución de bases

Figura 5. Estructura del ADN de cloroplasto. Es una molécula circular con una región repetida inversa (representada por las líneas oscuras). La parte superior a la región repetida se conoce como porción grande única y la inferior como porción pequeña única. Las zonas menos variables son las regiones repetidas inversas y se usan para niveles taxonómicos superiores a familia.

en el sitio de restricción puede resultar en la pérdida o ganancia de sitios de restricción, un nuevo sitio produce la pérdida de un fragmento y la ganancia de dos cuya suma dará el tamaño del fragmento perdido (ver figura 6). Este último cambio es específico para una sola enzima, mientras que los dos primeros afectan el patrón de fragmentos de todas las enzimas que corten en la región.

Se puede utilizar como carácter la presencia/ausencia de un fragmento de determinado tamaño sólo cuando la divergencia entre los taxa es menor al 15%. Sin embargo, después de este valor el tamaño de los fragmentos se puede deber a una convergencia, es decir que el fragmento tenga el mismo tamaño pero que los sitios de corte que lo producen sean diferentes. Para evitar este problema, los sitios se mapean sobre la molécula.

Técnica

Lo más común es aislar ADN total por el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1987) y purificarlo por ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio y bromuro de etidio. Se corta con las enzimas de restricción elegidas y los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Algunas variantes como amplificar primero y cortar después también se usan (Dowling *et al.*, 1996; Rieseberg *et al.*, 1992). Las concentraciones del gel de agarosa se pueden variar, dependiendo del número de fragmentos que genere la enzima, entre el 0.7% y el 2.0%. El gel se desnaturaliza alcalinamente para transferir una réplica del ADN de una sola cadena a una membrana de nylon o nitrocelulosa. Esta membrana se hibridiza a fragmentos de ADN ya sea nuclear o de cloroplasto conocidos y marcados con un nucleótido radioactivo, generalmente con ^{32}P aunque también existen métodos que no utilizan radioactividad (Dowling *et al.*, 1996). Las membranas se autoradiografían y se leen los fragmentos (ver figura 6). Para evitar detectar convergencias en los sitios de restricción, los fragmentos se mapean, lo que también permite identificar y localizar los rearrreglos en las secuencias, duplicaciones y variaciones en longitud.

Aplicación.

1. *ADN ribosomal.* Se ha utilizado para comparar la divergencia entre especies cultivadas y sus posibles progenitores (Doyle y Beachy, 1985), entre complejos de especies (Crawford *et al.*, 1992) y entre géneros (Doyle *et al.*, 1985). La porción 17S-25S se usó por Soltis y Soltis (1991) para probar el origen múltiple de un alotetraploide.

Figura 6. Autorradiografía de los fragmentos generados por la enzima BstNI en la zona adyacente inmediata a la región repetida inversa del ADN de cloroplasto en *Physalis* y géneros afines. En los taxa señalados por las flechas se generó un sitio que cortó el fragmento superior (de 5.2) produciendo dos nuevos fragmentos (3.1 + 2.1).

En algunos estudios (Crawford *et al.*, 1992; Miao *et al.*, 1995) se combina el uso de enzimas de restricción en cloroplasto y ribosomas debido a que el ribosomal se hereda por los dos padres y recombina, por lo que sirve para detectar hibridización y evolución reticulada, que no se puede detectar con el ADN de cloroplasto.

2. *ADN de cloroplasto*. La mayoría de los estudios en poblaciones de la misma especie han encontrado que la variación en ADN de cloroplasto es baja (Palmer y Zamir, 1982; Banks y Birky, 1985). Algunas especies (Soltis *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1993; Brunsfeld *et al.*, 1992) y complejos de especies (Mayr y Soltis, 1994) presentan variación dentro de las poblaciones, por lo que sus posibilidades de uso a este nivel dependerán de la planta.

A nivel de géneros, el ADN de cloroplasto se ha utilizado para detectar ancestros de plantas cultivadas (Doebley *et al.*, 1987), para detectar relaciones evolutivas entre especies de una sección (Brunsfeld *et al.*, 1992; Spooner y Sytsma, 1992), para delimitar clasificaciones subgenéricas (Vaillancourt *et al.*, 1993; Wiegreffe *et al.*, 1994 secciones, Bruneau y Doyle, 1993, subgéneros) para examinar la evolución de caracteres morfológicos adaptativos (Smith y Sytsma, 1994), para cambiar de género especies morfológicamente problemáticas (Palmer y Zamir, 1982; Sytsma y Gottlieb, 1986), para transferir especies entre géneros cercanos (Potter y Doyle, 1994) y en biogeografía (Wendel y Albert, 1992; Crawford *et al.*, 1992).

Para tribu y subtribu se han usado para probar si los grupos son monofiléticos (Doyle y Doyle, 1993; Urbatsch y Jansen, 1995) y para entender las relaciones entre los géneros de una tribu (Miao *et al.*, 1995).

A niveles taxonómicos superiores, los cambios estructurales como la longitud de los fragmentos pueden limitar el uso de esta técnica. Sin embargo, mapeando cuidadosamente, se ha utilizado para determinar la filogenia de las tribus y las relaciones de las subfamilias en las Asteraceae (Palmer *et al.*, 1988) y para las Solanaceae (Olmstead y Palmer, 1992).

Recientemente se ha usado la técnica para resolver problemas en orden (Caryophyllales, Downie y Palmer, 1994), subclase (Hamamelididae, Manos *et al.*, 1993) y clase (monocotiledóneas, Davis, 1995), para lo que se limita el análisis a la zona de inversión repetida, que es altamente conservada.

Secuencias

El uso de secuencias es actualmente uno de los métodos más comúnmente utilizados. A diferencia de las enzimas de restricción, con las que se muestrean partes

del genoma, las secuencias analizan todas las unidades básicas de información de un organismo (Hillis *et al.*, 1996). Para ser filogenéticamente informativa, la secuencia debe ser ortóloga. Los caracteres están representados por la posición en la secuencia del gen, mientras que los estados de carácter son los nucleótidos que se encuentran en esa posición (Swofford *et al.*, 1996). Por eso es muy importante alinear las secuencias obtenidas lo mejor posible antes de utilizarlas y descartar las zonas dudosas (Giannasi *et al.*, 1992; Bult y Zimmer, 1993).

En plantas, los genes que se han usado provienen del núcleo (ribosomal) o del cloroplasto (rbcL y ndhF). El ADN ribosomal (ver figura 4) se utiliza por ser muy abundante y por tener una evolución rápida y con diferentes tasas entre sus subunidades y espaciadores (Jorgansen y Cluster, 1988). La región del espaciador interno (ITS) diverge más rápido que el ADN de cloroplasto aunque la tasa varía de grupo a grupo (Baldwin, 1993; Suh *et al.*, 1993). De los genes de cloroplasto, el rbcL evoluciona a una tasa mucho más conservada (Zurawski y Clegg, 1987) y se usa a nivel de familia y subfamilia. El ndhF tiene una tasa de evolución molecular relativamente rápida y es casi un 50% más largo que el rbcL, por lo que se puede usar para grupos que no se han podido resolver con el rbcL (Clark *et al.*, 1995).

Técnica

Este tipo de estudio incluye cuatro etapas, que son: 1] identificar la secuencia que tenga la variación necesaria (ver arriba y tabla 1), 2] aislar y purificar un número elevado de la secuencia (ya sea por clonación, amplificación o transcripción), 3] secuenciar y 4] alinear la secuencia. Las tres técnicas que se han utilizado para secuenciar son la química, la enzimática y la automática. La química o de Maxam-Gilbert consiste en dividir el ADN en cuatro muestras y tratarlas con agentes químicos que rompen el ADN específicamente en cada base, bajo condiciones en las que sólo unos pocos nucleótidos del fragmento se afectan. Los fragmentos se marcan con radioactividad y se autoradiografían.

La enzimática o de Sanger se basa en la interrupción de la replicación de ADN por enzimas. La doble cadena se desnaturaliza para obtener un template al que se añade un fragmento corto (15-18 pares de bases, el "primer") complementario al ADN a investigar. La muestra se divide en 4 submuestras y a cada una se añaden los cuatro deoxinucleótidos (dATP, dCTP etc., uno de los cuales va marcado con radiactividad), uno de los dideoxinucleótidos (ddNTP) y la polimerasa. La secuencia original se va aumentando por la polimerasa usando el patrón, pero al añadirse

Figura 7. Aspecto de una autorradiografía de secuencias. De izquierda a derecha, las líneas corresponden a G, A, T y C. La secuencia entre las flechas correspondería entonces a GATAATCC.

el ddNTP la reacción se interrumpe debido a que le falta el radical 3'OH al azúcar. Las cuatro muestras se separan en geles de poliacrilamida, se autoradiografían y se leen (ver figura 7).

La secuencia automática utiliza la reacción de Sanger pero con fluorescencia en vez de radiactividad, que se detecta por medio de un laser. La secuencia se pasa directamente a la computadora o al papel sin necesidad de leer los geles.

La alineación de las secuencias se puede hacer "a mano" por medio de un editor o bien por medio de programas de computadora (Swofford *et al.* 1996).

Aplicación

Debido a sus diferentes tasas de evolución, el ADN ribosomal es el que se ha usado a más niveles taxonómicos. Los espaciadores (ITS 1 y 2) y el cistron 5.8 S se han usado a nivel de géneros, subgéneros y secciones (Baldwin, 1993; Sang *et al.*, 1995; Baum *et al.*, 1994). Para comparar familias y géneros dentro de una familia se utilizan las porciones 18S y 26 S (Nickrent y Franchina, 1990 ; Bult y Zimmer, 1993; Hamby y Zimmer 1988).

Los genes de cloroplasto sirven para niveles taxonómicos mayores. El *rbcL* se ha usado para determinar los linajes de subfamilias (Barker *et al.*, 1995), para delimitar familias problemáticas (Eguiarte 1995), para determinar las relaciones entre familias cercanas (Brunsfield *et al.*, 1994). A nivel de orden se utilizó por Giannasi *et al.* (1992). El *ndhF* se ha usado a nivel de familia (Clark *et al.* 1995).

Conclusiones y perspectivas

Las técnicas moleculares son una herramienta poderosa para ayudar a resolver problemas en sistemática. Una de sus principales bondades es la gran cantidad de caracteres que aportan. Esto permite que se puedan utilizar en grupos con morfología muy reducidas (como parásitas) en los que sería difícil aplicar otra técnica que diera el mismo número de caracteres. Una aplicación importante es la valoración de caracteres considerados de valor taxonómico en grupos en los que la rápida divergencia morfológica o la selección sobre ciertos caracteres deseables han oscurecido sus relaciones, como en plantas cultivadas.

Hay que considerar que existen aún algunos problemas de interpretación de los resultados, especialmente en técnicas menos exploradas como la hibridación ADN/ADN. Estas limitantes serán menos importantes si los datos obtenidos por medio de marcadores moleculares se combinan con otro tipo de evidencia, ya sea morfológica, de cromosomas, fitoquímica,

palinológica o anatómica. Es necesario asegurar que los resultados que se comparen sean homólogos, de manera que los cortes de las enzimas de restricción se deben mapear y las secuencias se deben alinear. Es importante tener en cuenta que las filogenias resultantes de estos estudios son de las moléculas, y que no necesariamente corresponden de manera idéntica con la filogenia de las especies, por lo que puede haber discrepancias entre las filogenias obtenidas por medio de diferentes técnicas. Asimismo, habrá problemas que se puedan resolver más fácil, rápido y barato por medio de otras técnicas, por lo que no será necesario aplicar las moleculares.

Aunque existen lineamientos generales para decidir qué técnica aplicar a determinados niveles taxonómicos (ver tabla 1), en realidad la utilidad de cada método está limitada por el genoma del grupo a estudiar. Habrá técnicas que en alguna familia sirvan para delimitar géneros, pero habrá familias en las que no haya la suficiente variabilidad como para aportar los datos necesarios para resolver el grupo. Debido a que los materiales de uso continuo (como enzimas o nucleótidos) son caros, es conveniente establecer un estudio piloto antes de emprender un proyecto ambicioso que no aporte los datos esperados, debido a las características del genoma estudiado.

Es indudable que cada vez es más fácil utilizar estos marcadores debido a los adelantos técnicos, como los amplificadores o los secuenciadores automáticos así como por el gran número de enzimas de restricción que se han aislado recientemente. Esto no quiere decir que haya técnicas que tiendan a desaparecer (como se pensó para las isoenzimas al aparecer los RAPDS) ya que los métodos se complementan entre sí, o bien sirven para diferentes niveles taxonómicos o problemas.

Agradecimientos

A Ken Oyama por la invitación a participar en el simposio sobre marcadores moleculares y la revisión del manuscrito. A Patricia Dávila por su ayuda con la bibliografía. A Luis Hernández por la revisión del manuscrito, su ayuda en la preparación de las transparencias para el simposio y el gel de isoenzimas. A Adriana García M. por las ilustraciones para la publicación. A Luis Eguiarte la ayuda con la bibliografía y la ilustración de las secuencias. A tres revisores anónimos sus acertadas sugerencias.

Literatura citada

Baldwin B.G. 1993. Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on its sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution

reexamined. *American Journal of Botany* 80:222-238.

Banks J.A., Birky C.W. 1985. Chloroplast DNA diversity is low in a wild plant *Lupinus texensis*. *Proceedings National Academy of Science USA* 82:6950-6954.

Barker N.P., Linder H.P., Harley E.H. 1995. Polyphyly of Arundinoideae (Poaceae): evidence from rbcL sequence data. *Systematic Botany* 20:423-435.

Baum D.A., Sytsma K.J., Hoch D.C. 1994. A phylogenetic analysis of *Epilobium* (Onagraceae) based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Systematic Botany* 19:363-388.

Baverstock P.R., Moritz C. 1996. Project design. 17-27. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. *Molecular Systematics*. Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.

Belford H.S., Thompson W.F. 1981. Single copy DNA homologies in *Atriplex*. I. Crop reactivity estimates and the role of deletions in evolution. *Heredity* 46:91-108.

Bendich A.J., McCarthy B.J. 1970. DNA comparisons among some biotypes of wheat. *Genetics* 65:657-673.

Bremer K., Wanntrop H.E. 1978. Phylogenetic systematics in botany. *Taxon* 27:317-329.

Bruneau A., Doyle J.J. 1993. Chloroplast DNA phylogenetic studies in New World Phaseolinae (Leguminosae: Papilionoideae:Phaseoleae). *Systematic Botany* 18:6-17.

Brunsfeld S.J., Soltis D.E., Soltis P. 1992. Evolutionary patterns and processes in *Salix* sect. *Longifoliae*: evidence from chloroplast DNA. *Systematic Botany* 17:239-256.

Bult C.J., Zimmer E.A. 1993. Nuclear ribosomal RNA sequences for inferring tribal relationships within Onagraceae. *Systematic Botany* 18:48-63.

Buth D.G. 1984. The application of electrophoretic data in systematic studies. *Annual Review Ecological Systematics* 15:501-522.

Clark L.G., Zhang W., Wendel J.F. 1995. A phylogeny of the grass family (Poaceae) based on ndhF sequence data. *Systematic Botany* 20:436-460.

Crawford D.J. 1989. Enzyme electrophoresis and plant systematics. 146-164. En: Soltis, D.E., Soltis P.S. Eds. *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press. Oregon.

Crawford D.J. 1990. *Plant molecular systematics, macromolecular approaches*. John Wiley & Sons. New York.

Crawford D.J., Bayer R.J. 1981. Allozyme divergence in *Coreopsis cyclocarpa* (Compositae). *Systematic Botany* 6:373-386.

Crawford D.J., Stussey T.F., Silva O. M. 1987. Allozyme divergence and the evolution of *Dendroseris* (Compositae: Lactuceae) on the Juan Fernández Islands. *Systematic Botany* 12:435-443.

Crawford, D.J., Stuessy T.F., Cosner M.B., Haines D.W., Silva M., Baeza M. 1992. Evolution of the genus *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae) on the Juan Fernández Islands: evidence from cp and rDNA. *Systematic Botany* 17:676-682.

Chase M.W., Stevenson D.W., Wilkin P., Rudall P.J. 1995. Monocot systematics: a combined analysis. 623-661 En: Ruddall P.J., Cribb P.J., Cutler D.F., Humphries C.J. (Eds.)

- Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens Kew. Great Britain.
- Chiang F., Davila P., Villaseñor J.L. 1994. Panorama actual de la taxonomía vegetal en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 55:19.
- Davis J.I. 1995. A phylogenetic structure for the monocotyledons, as inferred from chloroplast DNA restriction site variation, and a comparison of measures of clade support. *Systematic Botany* 20:503-527.
- Doebley J.F., Renfroe W., Blanton A. 1987. Restriction site variation in *Zea* chloroplast genome. *Genetics* 117:139-147.
- Dowling T.E., Moritz C., Palmer J.D., Rieseberg L.H. 1996. Nucleic Acids III: Analysis of fragments and restriction sites. 249-317. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. *Molecular Systematics*. Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Downie S.R., Palmer J.D. 1994. A chloroplast DNA phylogeny of the Caryophyllales based on structural and inverted repeat site variation. *Systematic Botany* 19:236-252.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1993. Chloroplast DNA phylogeny of the Papilionoid legume tribe Phaseoleae. *Systematic Botany* 18:309-327.
- Doyle J.J., Beachy R.N. 1985. Ribosomal gene variation in soybean (*Glycine*) and its relatives. *Theoretical and Applied Genetics* 70:369-376.
- Doyle J.J., Soltis P.S., Soltis D.E. 1985. Ribosomal RNA gene sequence variation: *Tolmiea*, *Tellima* and their intergeneric hybrid. *American Journal of Botany* 72:1388-1391.
- Eguiarte L.E. 1995. Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56:45-56.
- Epes D.A., Soltis D.E. 1984. An electrophoretic investigation of *Galax urceolata* (Diapensiaceae) *American Journal of Botany* 71:165.
- Felsenstein J. 1984. The statistical approach to inferring evolutionary trees and what it tells us about parsimony and compatibility. 169. En: Duncan T., Stuessy T.F. eds. *Cladistics: perspectives on the reconstruction of evolutionary history*. Columbia University Press. New York.
- Giannasi D.E., Zurawski G., Learn G., Clegg M.T. 1992. Evolutionary relationships of the Caryophyllidae based on comparative rbcL sequences. *Systematic Botany* 17:1-15.
- Goldberg R.B., Bemis W.P., Siegel A. 1972. Nucleic acid hybridization studies within the genus *Cucurbita*. *Genetics* 72:253-256.
- Gottlieb L.D. 1971. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. *BioScience* 21:939-944.
- Gottlieb L.D. 1973. Genetic differentiation, sympatric speciation, and the origin of a diploid species of *Stephanomeria*. *American Journal of Botany* 60:545-553.
- Gottlieb L.D. 1974. Genetic confirmation of the origin of *Clarkia lingulata*. *Evolution* 28:244-250.
- Hamby R.K., Zimmer E.A. 1988. Ribosomal RNA sequences for inferring phylogeny within the grass family. *Plant Systematics and Evolution* 160:29-37.
- Hillis D.M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:23-42.
- Hillis D.M., Mable B.K., Larson A., Davis S.K., Zimmer E.A. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and cloning. 321-378. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. *Molecular Systematics*. Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Jeffries R.L., Gottlieb L.D. 1982. Genetic differentiation of the microspecies *Salicornia europaea* L. (*sensu stricto*) and *S. ramosissima* J. Woods. *New Phytologist* 92:123-129.
- Jorgensen R.A., Cluster P.D. 1988. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters of evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75:1238-1247.
- Kress W.J. 1995. Phylogeny of the Zingiberanae morphology and molecules. 623-661. En: Ruddall P.J., Cribb P.J., Cutler D.F., Humphries C.J. (Eds.) *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens Kew. Great Britain.
- Lowrey T.K., Crawford D.J. 1985. Allozyme divergence and evolution in *Tetramolopium* (Compositae: Asteraceae) on the Hawaiian Islands. *Systematic Botany* 10:64-72.
- Manos P.S., Nixon K.C., Doyle J.J. 1993. Cladistic analysis of restriction site variation within the chloroplast DNA inverted repeat region of selected Hamamelididae. *Systematic Botany* 18:551-562.
- Mayr E. 1974. Cladistic analysis or cladistic classification? *Zoology Systematic Evolution* 12:94-128.
- Mayr E. 1981. Biological classification: towards a synthesis of opposing methodologies. *Science* 214:94-128.
- Mayr M.S., Soltis P.S. 1994. The evolution of serpentine endemic: a chloroplast DNA phylogeny of the *Streptanthus glandulosa* complex (Cruciferae). *Systematic Botany* 19:557-594.
- McLeod M.J., Guttman S.I., Eshbaugh W.H., Rayle R.E. 1983. An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). *Evolution* 37:562-574.
- Miao B., Turner B.L., Mabry T.J. 1995. Systematic implications of chloroplast DNA variation in the subtribe *Ambrosiinae* (Asteraceae: Helianthae). *American Journal of Botany* 82:924-932.
- Moritz C., Hillis D.M. 1996. Molecular systematics: context and controversies. 1-12. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. *Molecular Systematics*. Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Murphy R.W., Sites J.W., Buth D.G., Haufler C.H. 1996. Proteins I: Isozyme electrophoresis. 51-116. En: Hillis

- D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. *Molecular Systematics*. Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Nelson G. 1973. Classification as an expression of phylogenetic relationships. *Systematic Zoology* **22**:344-359.
- Nickrent D.L., Franchina C.R. 1990. Phylogenetic relationships on the Santanales and relatives. *Journal of Molecular Evolution* **31**:294-301.
- Nickrent D.L., Guttman S.I., Eshbaugh W.H. 1984. Biosystematic and evolutionary relationships among selected taxa of New World *Arceuthobium*. En: Hawksworth F.G., Sharp R.F. eds. *Biology of dwarf mistletoes: proceedings of the symposium*. US Department of Agriculture, Forestry Series Genetic Technology Report RM-111. 20-35.
- Olmstead R.G., Palmer J.D. 1992. A cpDNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **79**:346-360.
- Olmstead R.G., Palmer J.D. 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany* **81**:1205-1224.
- Palmer J.D., Jansen R.K., Michaels H.J., Chase M.W., Manhart J.R. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **75**:1180-1206.
- Palmer J.D., Zamir D. 1982. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **79**:5006-5010.
- Pinkas R.D., Zamir D., Ladizinsky G. 1985. Allozyme divergence and evolution in the genus *Lens*. *Plant Systematic and Evolution* **151**:131-140.
- Potter D., Doyle J.J. 1994. Phylogeny and systematics of *Sphenostylis* and *Nesphostylis* (Leguminosae: Phaseoleae) based on morphological and chloroplast DNA data. *Systematic Botany* **19**:389-406.
- Rick C.M., Kesicki E., Forbes J.F., Holle M. 1976. Genetic and biosystematic studies of two new sibling species of *Lycopersicon* from interandean Peru. *Theoretical and Applied Genetics* **47**:55-68.
- Rieseberg L.H., Hanson A., Philbrick C.T. 1992. Androdioecy is derived from dioecy in Datisceae: evidence from restriction site mapping of PCR-amplified chloroplast DNA fragments. *Systematic Botany* **17**:324-336.
- Sang T., Crawford D.J., Stuessy T.F., Silva O.M. 1995. ITS sequences and the phylogeny of the genus *Robinsonia* (Asteraceae). *Systematic Botany* **20**:55-64.
- Scotland R.W. 1992. Cladistic theory. 3-13. En: Forey P.L., Humphries C.J., Kitching I.L., Scotland R.W., Siebert D.J., Williams D.M. *Cladistics, a practical course in systematics*. Clarendon Press. Oxford.
- Sheldon F.H., Kinnarney M. 1993. The effects of sequence removal on DNA hybridization estimates on distance, phylogeny, and rates of evolution. *Systematic Biology* **42**:32-47.
- Smith J.F., Sytsma K.J. 1994. Evolution in the andean epiphytic genus *Columnea* (Gesneriaceae) II. Chloroplast DNA restriction site variation. *Systematic Botany* **19**:317-336.
- Soltis D.E., Rieseberg L.H. 1986. Autopolyploidy in *Tolimea menziesii* (Saxifragaceae): genetic insight from enzyme electrophoresis. *American Journal of Botany* **73**:310-318.
- Soltis D.E., Soltis P.S. 1991. Multiple origins of the allotetraploid *Tragopogon mirus* (Compositae): rDNA evidence. *Systematic Botany* **16**:407-413.
- Soltis D.E., Soltis P.S., Ness B.D. 1989. High levels of chloroplast DNA variation and multiple origins of autopolyploidy in *Heuchera micrantha* (Saxifragaceae). *Evolution* **43**:650-656.
- Spooner D.M., Sytsma K.J. 1992. Reexamination of series relationships of Mexican and Central American wild potatoes (*Solanum* sect. *Petota*): evidence from chloroplast DNA restriction site variation. *Systematic Botany* **17**:432-449.
- Stuessy T.F. 1990. *Plant taxonomy*. Columbia University Press. New York.
- Suh Y., Thien L.B., Reeve H.E., Zimmer E.A. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *American Journal of Botany* **80**:1042-1053.
- Systma K.J., Gottlieb L.D. 1986. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Clarkia* sect. *Peripetasma* (Onagraceae). *Evolution* **40**:1248-1261.
- Swofford D.L., Olsen G.J., Waddell P.J., Hillis D.M. 1996. Phylogenetic inference. 407-510. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. *Molecular Systematics*. Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Uhl N.W., Dransfield J., Davis J.I., Luckow M.A., Hansen K.S., Doyle J.J. 1995. Phylogenetic relationships among palms: cladistic analyses of morphological and chloroplast DNA restriction site variation. 623-661. En: Ruddal P.J., Cribb P.J., Cutler D.F., Humphries C.J. (Eds.) *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens Kew. Great Britain.
- Urbatsch L.E., Jansen R.K. 1995. Phylogenetic affinities among and within the coneflower genera (Asteraceae, Heliantheae), a chloroplast DNA analysis. *Systematic Botany* **20**: 28-39.
- Vaillancourt R.E., Weeden N.F., Bruneau A., Doyle J.J. 1993. Chloroplast DNA phylogeny of Old World *Vigna* (Leguminosae). *Systematic Botany* **18**:642-651.
- Wendel J.F., Albert V.A. 1992. Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium*): character-state weighted parsimony analysis of chloroplast DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications. *Systematic Botany* **17**:115-143.
- Wendel J.F., Weeden N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. En Soltis, D.E., Soltis P.S. Eds. *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press. Oregon.
- Werman S.D., Springer M.S., Britten R.J. 1996. Nucleic acids I: DNA-DNA hybridization. 169-201. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. *Molecular Systematics*. Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Werth C.R. 1985. Implementing an isozyme laboratory at a field station. *Virginia Journal of Science* **36**:55-76.

- Werth C.R., Guttman S.I., Eshbaugh W.H. 1985. Electrophoretic evidence of reticulate evolution in the Appalachian *Asplenium* complex. *Systematic Botany* **10**:184-192.
- Whalen M.D. 1979. Allozyme variation and evolution in *Solanum* section *Androceras*. *Systematic Botany* **4**:203-222.
- Whalen M.D., Caruso E.E. 1983. Phylogeny in *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae): congruence of morphological and molecular data. *Systematic Botany* **8**:369-380.
- Wiegrefe S.J., Sytsma K.J., Guries R.P. 1994. Phylogeny of elms (*Ulmus*, Ulmaceae): Molecular evidence for a sectional classification. *Systematic Botany* **19**:590-612.
- Wiley E.O. 1980. Phylogenetic systematics and vicariance biogeography. *Systematic Botany* **5**:194-220.
- Wilson A.C., Sarich V.M., Maxson L.R. 1974. The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies of rates of chromosomal, protein and anatomical evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **71**:3028-3030.
- Wilson A.C., Carlson S.S., White T.J. 1977. Biochemical evolution. *Annual Review of Biochemistry* **46**:473-639.
- Wolf P.G., Soltis P.S., Soltis D.E. 1993. Phylogenetic significance of chloroplast DNA restriction site variation in the *Ipomopsis aggregata* complex and related species (Polemoniaceae). *Systematic Botany* **18**:652-662.
- Zurawski G., Clegg M.T. 1987. Evolution of higher plant chloroplast DNA-encoded genes: implications for structure-function and phylogenetic studies. *Annual Review of Plant Physiology* **38**:391-418.